

令和元年6月6日現在

機関番号：36301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K00932

研究課題名(和文) SHRSPラットを用いた柑橘由来成分の血管性認知機能障害防御機構の解析

研究課題名(英文) The effects of citrus-related compounds on global cerebral ischemic injury in SHRSP.

研究代表者

奥山 聡 (OKUYAMA, SATOSHI)

松山大学・薬学部・准教授

研究者番号：40550380

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、高血圧自然発症脳卒中易発症ラット(SHRSP)を用いて、脳卒中に引き起こされる脳機能障害に対して、柑橘由来成分であるヘプタメトキシフラボン(HMF)およびナリンギン(NGI)が、脳保護作用を示すかどうかを検討した。SHRSPでは一過性の全脳虚血によって脳海馬における神経細胞死が誘発されることから、脳梗塞急性期におけるHMFおよびNGIの効果を確認したところ、それぞれの群で神経細胞死が抑制されていた。またSHRSPに対し、脳虚血手術をすることなくHMFまたはNGIの投与を行い、記憶学習試験を行ったところ、記憶獲得と保持の両評価においてHMF投与群では良好な値を示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

今回の実験により、SHRSPの一過性全脳虚血でみられる海馬CA1領域の神経細胞死は、HMFとNGIの投与により抑制されることが明らかとなった。また記憶学習試験の結果においても、特にHMF投与によって記憶獲得および記憶保持の成績が良好であった。以上の実験より、SHRSPで引き起こされる脳機能障害に対して、HMFおよびNGIは予防的に働く作用を持つことが示唆された。近年の高齢化によって、脳血管疾患患者の増加が懸念されている。脳卒中発症者の半分以上が死亡または介護が必要な状態になることから、脳卒中の発症予防が非常に重要であると考えられ、これらの化合物による脳保護効果が期待できる。

研究成果の概要(英文)：In this study, we performed whether heptamethoxyflavone (HMF) and naringin (NGI), which are citrus-derived components, suppress the brain dysfunction using stroke-prone spontaneously hypertensive rat (SHRSP). Since a transient global cerebral ischemia induces neuronal cell death in the hippocampus in SHRSP, the effects of HMF and NGI were confirmed in the acute phase of cerebral infarction. In this experiment, neuronal cell death was suppressed in each group. In addition, when HMF or NGI was administered to SHRSP without cerebral ischemic surgery, and a passive avoidance test was performed, HMF-treated group showed a good value in both evaluations of memory acquisition and retention.

研究分野：薬理学、食品栄養科学

キーワード：SHRSP 脳梗塞 柑橘成分

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

近年の高齢化によって、脳血管疾患患者の増加が懸念されている。脳卒中発症者の半分以上が死亡または介護が必要な状態になることから、脳卒中の発症予防が非常に重要であると考えられるが、有効な手段は多くない。高血圧および脳卒中に関する研究において、ヒト本態性高血圧のモデル動物である高血圧自然発症ラット SHR (spontaneously hypertensive rat) と、本態性高血圧・脳血管疾患のモデル動物である脳卒中易発症高血圧自然発症ラット SHRSP (stroke-prone spontaneously hypertensive rat) は非常に有用な病態モデル動物であることから、両モデル動物が汎用されている。本研究課題においては SHRSP を用いて、脳血管障害に対する柑橘果皮由来成分の予防効果を確認する実験を行った。

2. 研究の目的

SHRSP は、重度の高血圧に加え、脳血管障害を高率に自然発症するモデルであり、神経細胞やアストロサイト、また血液脳関門などに脆弱性が認められる。SHRSP に対して一過性全脳虚血手術を施すと、脳海馬における遅発性神経細胞死が顕著に起こることから、脳梗塞急性期における神経細胞障害のモデルとしても有用である。

愛媛県特産柑橘の1つである「河内晩柑」の果皮には、ポリメトキシフラボンの一種である 3,5,6,7,8,3',4'-heptamethoxyflavone (HMF) やフラバノン配糖体の一種である naringin (NGI) が多く含まれている。これまでに我々は HMF および NGI が、マウス全脳虚血モデルにおいて脳海馬における神経細胞死抑制作用を示すことを明らかにしてきた。これらは、SHRSP の脳血管障害においても症状の予防効果が期待できることから、本研究課題では SHRSP に HMF または NGI を投与し、行動薬理的、組織化学的手法により脳機能変化の解析を行った。

3. 研究の方法

<実験1>

12 週齢時にラット両側総頸動脈流をクリップで 20 分間一時的に遮断、その後再灌流することで全脳虚血モデルを作製した。脳虚血手術 1 週間後、解剖により脳組織を得て各種組織化学的解析を行った。HMF および NGI はそれぞれ、9 週齢から 13 週齢まで混餌投与を行った。

<実験2>

SHRSP に対し、脳虚血手術をすることなく 8 週齢から 15 週齢まで HMF もしくは NGI の混餌投与を行い、15 週齢時に記憶学習試験の一つである Passive avoidance test を行った。

Group	Operation	Sample (free access)
WKY (対照群)	全脳虚血	通常食 (SPR)
SHRSP	全脳虚血	通常食 (SPR)
SHRSP + NGI 0.125%投与群 (N1)	全脳虚血	ナリンギン 0.125%添加 SPR
SHRSP + NGI 0.25%投与群 (N2)	全脳虚血	ナリンギン 0.25%添加 SPR
SHRSP + HMF 0.063%投与群 (H1)	全脳虚血	ヘプタメトキシフラボン 0.063%添加 SPR
SHRSP + HMF 0.125%投与群 (H2)	全脳虚血	ヘプタメトキシフラボン 0.125%添加 SPR

4. 研究成果

<実験1>

脳海馬における神経細胞の形態変化について評価したところ、SHRSP では海馬錐体細胞層 CA1 および CA2 領域において神経細胞死が見られたが、HMF と NGI それぞれの投与群では神経細胞死が抑制されていた。また、SHRSP ではグリア細胞の一つであるミクログリアの活性化が見られたが、HMF と NGI それぞれの投与群で活性化を抑制し、特に HMF で効果が強かった (図1)。

<実験2>

Passive avoidance test の結果、記憶獲得試行および記憶保持試行の評価において、HMF 投与群では高い値を示した (図2)。脳海馬の組織学的解析においては、神経細胞、アストロサイト、ミクログリアのいずれについても、各群間に大きな差は見られなかった。

<まとめ>

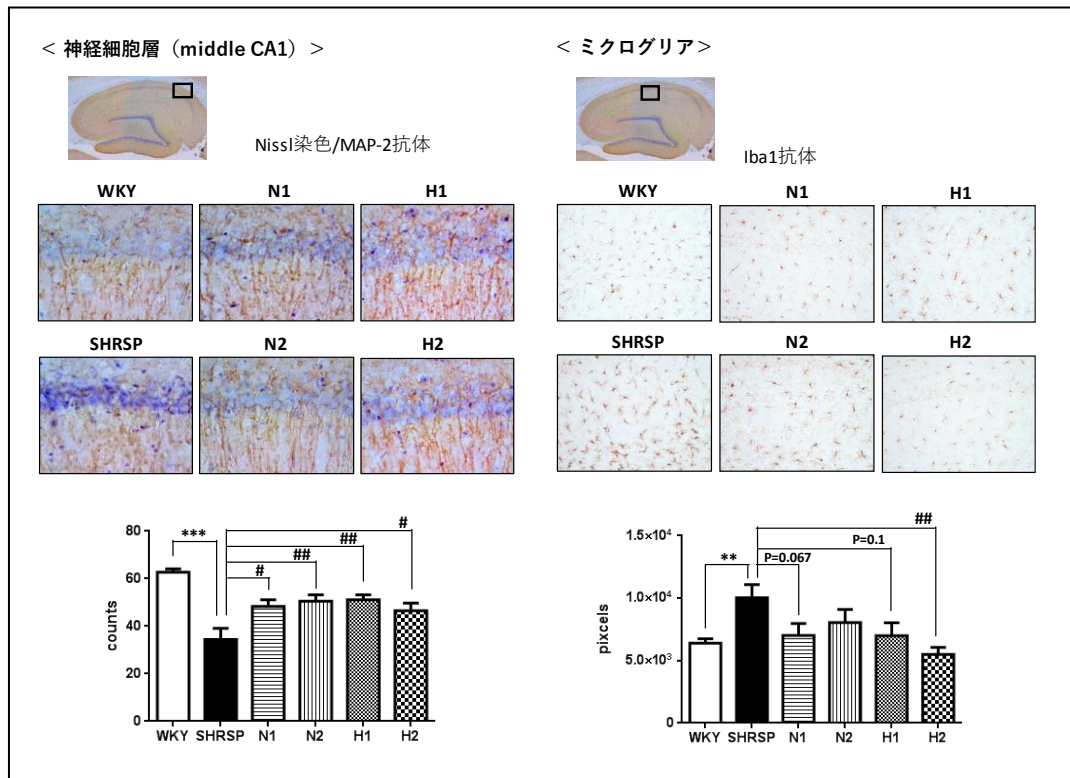
今回の実験により、SHRSP の一過性全脳虚血でみられる海馬 CA1 および CA2 領域の神経細胞死は、HMF と NGI の投与により抑制されることが明らかとなった。ミクログリアの活性化は酸化ストレスや炎症反応等に関与し、神経細胞死にも影響を及ぼすことから、HMF および NGI に

よる抗炎症作用や抗酸化作用が神経細胞死抑制に関与しているものと考えられる。詳細な作用メカニズムについては現在も解析を進めている。

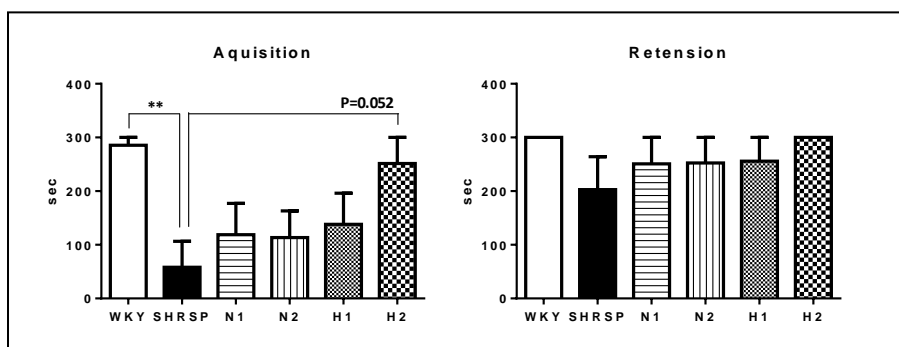
また、SHRSP に対し HMF もしくは NGI の投与を行い、Passive avoidance test で評価したところ、特に HMF 投与によって記憶獲得および記憶保持の成績が良好であった。神経細胞、アストロサイト、ミクログリアなどの組織学的評価には大きな差は見られなかったが、細胞内シグナル変化について現在も解析を進めている。

以上の実験より、SHRSP で引き起こされる脳虚血障害に対して HMF および NGI は、予防的に働く作用を持つことが示唆される結果が得られた。

(図 1)



(図 2)



5. 主な発表論文等

[学会発表] (計 2 件)

- ① 玉那覇アリサ、奥山聡、大久保優、富永知志、澤本篤志、中島光業、古川美子「SHRSP の全脳虚血障害に対するナリンギンの作用」第 57 回日本薬学会・日本薬剤師会・日本病院薬剤師会 中国四国支部学術大会 (2018 年 11 月)
- ② 奥山聡、玉那覇アリサ、大久保優、永井美穂子、澤本篤志、中島光業、古川美子「脳卒中易発症ラットの全脳虚血障害に対するナリンギンおよびヘプタメトキシフラボンの作用」日本薬学会第 139 年会 (2019 年 3 月)

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：古川 美子

ローマ字氏名：FURUKAWA YOSHIKO

所属研究機関名：松山大学

部局名：薬学部

職名：教授

研究者番号（8桁）：20219108

研究分担者氏名：中島 光業

ローマ字氏名：NAKAJIMA MITSUNARI

所属研究機関名：松山大学

部局名：薬学部

職名：教授

研究者番号（8桁）：70311404

研究分担者氏名：並河 徹

ローマ字氏名：NABIKA TORU

所属研究機関名：島根大学

部局名：医学部

職名：教授

研究者番号（8桁）：50180534